

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Hiromi OHTAKI, et al.

GAU:

SERIAL NO: New Application

EXAMINER:

FILED: Herewith

FOR: BACTERIUM PRODUCING L-GLUTAMIC ACID AND METHOD FOR PRODUCING L-GLUTAMIC ACID

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

COUNTRY

APPLICATION NUMBER

MONTH/DAY/YEAR

JAPAN

2000-204256

July 5, 2000

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
☐ are submitted herewith
☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon

Registration No. 24,618

C. Irvin McClelland
Registration Number 21,124



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)



日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2000年 7月 5日

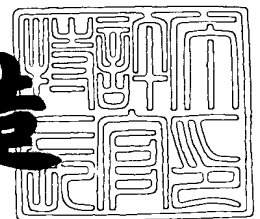
出 願 番 号
Application Number: 特願2000-204256

出 願 人
Applicant (s): 味の素株式会社

2001年 3月16日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3020747

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-7468

【提出日】 平成12年 7月 5日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 13/06
C12N 15/00

【発明の名称】 L-グルタミン酸生産菌及びL-グルタミン酸の製造法

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 大瀧 博美

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 中村 純

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 泉井 裕

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

【氏名】 中松 亘

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 03-3669-6571

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 L-グルタミン酸生産菌及びL-グルタミン酸の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 L-グルタミン酸生産能を有し、かつ、トレハロース合成能が低下又は欠失したコリネ型細菌。

【請求項2】 染色体上のトレハロース合成系酵素遺伝子に変異が導入又は破壊されたことによりトレハロース合成能が低下又は欠失した請求項1記載のコリネ型細菌。

【請求項3】 トレハロース合成系酵素遺伝子が、トレハロース-6-リン酸シンターゼをコードする遺伝子、マルトオリゴシルトレハロースシンターゼをコードする遺伝子又はこれらの両方の遺伝子である請求項2記載のコリネ型細菌。

【請求項4】 トレハロース-6-リン酸シンターゼをコードする遺伝子が配列番号30に記載のアミノ酸配列をコードし、マルトオリゴシルトレハロースシンターゼをコードする遺伝子が配列番号32に記載のアミノ酸配列をコードする請求項3記載のコリネ型細菌。

【請求項5】 請求項1～4のいずれか一項に記載のコリネ型細菌を培地に培養し、同培地中にL-グルタミン酸を生成、蓄積させ、同培地からL-グルタミン酸を採取することを特徴とするL-グルタミン酸の製造法。

【請求項6】 下記(A)又は(B)に示す蛋白質をコードするDNA。

(A) 配列番号30に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質。

(B) 配列番号30に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、トレハロース-6-リン酸シンターゼ活性を有する蛋白質。

【請求項7】 下記(a)又は(b)に示すDNAである請求項6記載のDNA。

(a) 配列番号29に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号484～1938からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号29に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号484～19

38からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、同塩基配列と55%以上の相同性を有し、かつ、トレハロース-6-リン酸シンターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項8】 下記(A)又は(B)に示す蛋白質をコードするDNA。

(A) 配列番号32に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質。

(B) 配列番号32に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、マルトオリゴシルトレハロースシンターゼ活性を有する蛋白質。

【請求項9】 下記(a)又は(b)に示すDNAである請求項8記載のDNA。

(a) 配列番号31に記載の塩基配列のうち、塩基番号82~2514からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号31に記載の塩基配列のうち、塩基番号82~2514からなる塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、同塩基配列と60%以上の相同性を有し、かつ、マルトオリゴシルトレハロースシンターゼ活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なL-グルタミン酸生産菌及びそれを用いた発酵法によるL-グルタミン酸の製造法に関する。L-グルタミン酸は、食品、医薬品等として重要なアミノ酸である。

【0002】

【従来の技術】

従来、L-グルタミン酸は、主としてブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属に属するいわゆるコリネ型L-グルタミン酸生産菌またはそれらの変異株を用いた発酵法により製造されている(アミノ酸発酵、学会出版センター、195~215頁、1986年)。

【0003】

発酵法によるＬ－グルタミン酸の製造においては、トレハロースが副生することが知られている。そこで、生成したトレハロースを分解又は代謝させる技術が開発されている。そのような技術として、トレハロース上での増殖能が誘発されたコリネ型細菌を用いてアミノ酸を発酵生産する方法（特開平5-276935）、及び、トレハロース分解酵素遺伝子が増幅されたコリネ型細菌を用いてアミノ酸を発酵生産する方法（大韓民国特許公報（B1）特165836）が知られている。しかし、Ｌ－グルタミン酸生産菌において、トレハロースの生成自体を抑制することは知られていない。

【0004】

エシェリヒア・コリにおいては、トレハロースの合成は、トレハロース－６－リン酸シンターゼによって触媒される。これらの酵素は、otsA遺伝子によってコードされていることが知られている。また、エシェリヒア・コリのotsA遺伝子破壊株は、高浸透圧培地にてほとんど生育できなくなることが報告されている（H. M. Glaever, et al., J. Bacteriol., 170(6), 2841-2849(1998)）が、otsA遺伝子の破壊と物質生産との関係は知られていない。

【0005】

一方、ブレビバクテリウム属細菌では、ブレビバクテリウム・ヘルボルムにおいてtreY遺伝子は知られているが、otsA遺伝子は知られていない。尚、マイコバクテリウム属細菌では、トレハロース生合成系酵素遺伝子として、otsA遺伝子及びtreY遺伝子とは別のtreS遺伝子によってコードされる産物（トレハロースシンターゼ（TreS））による反応を経由する経路が知られている（De Smet K. A., et al., Microbiology, 146(1), 199-208 (2000)）。しかし、この経路はマルトースを基質としており、グルコース、フルクトース又はシュクロースを原料とする通常のＬ－グルタミン酸発酵には関連性がない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題の一つは、コリネ型細菌を用いた発酵法によるＬ－グルタミン酸の製造において、トレハロースの副生を抑制し、Ｌ－グルタミン酸の生産効率を向上させることにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、ブレビバクテリウム属細菌はマイコバクテリウム・ツベルクロシスと同様にotsA遺伝子及びtreY遺伝子を保持していること、及び、少なくともこれらの遺伝子の一方を破壊することによって、L-グルタミン酸の生産効率が向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

【0008】

(1) L-グルタミン酸生産能を有し、かつ、トレハロース合成能が低下又は欠失したコリネ型細菌。

(2) 染色体上のトレハロース合成系酵素遺伝子に変異が導入又は破壊されたことによりトレハロース合成能が低下又は欠失した(1)のコリネ型細菌。

(3) トレハロース合成系酵素遺伝子が、トレハロース-6-リン酸シンターゼをコードする遺伝子、マルトオリゴシルトレハロースシンターゼをコードする遺伝子又はこれらの両方の遺伝子である(2)のコリネ型細菌。

(4) トレハロース-6-リン酸シンターゼをコードする遺伝子が配列番号30に記載のアミノ酸配列をコードし、マルトオリゴシルトレハロースシンターゼをコードする遺伝子が配列番号32に記載のアミノ酸配列をコードする(3)のコリネ型細菌。

(5) (1)～(4)のいずれかのコリネ型細菌を培地に培養し、同培地中にL-グルタミン酸を生成、蓄積させ、同培地からL-グルタミン酸を採取することを特徴とするL-グルタミン酸の製造法。

【0009】

(6) 下記(A)又は(B)に示す蛋白質をコードするDNA。

(A) 配列番号30に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質。

(B) 配列番号30に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、トレハロース-6-リン酸シンターゼ活性を有する蛋白質。

(7) 下記 (a) 又は (b) に示す DNA である (6) の DNA。

(a) 配列番号 29 に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号 484 ~ 1938 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列番号 29 に記載の塩基配列のうち、少なくとも塩基番号 484 ~ 1938 からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、同塩基配列と 55% 以上の相同性を有し、かつ、トレハロース-6-リン酸シンターゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

(8) 下記 (A) 又は (B) に示す蛋白質をコードする DNA。

(A) 配列番号 32 に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質。

(B) 配列番号 32 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、又は付加を含むアミノ酸配列からなり、かつ、マルトオリゴシルトレハロースシンターゼ活性を有する蛋白質。

(9) 下記 (a) 又は (b) に示す DNA である (8) の DNA。

(a) 配列番号 31 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 82 ~ 2514 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列番号 31 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 82 ~ 2514 からなる塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、同塩基配列と 60% 以上の相同性を有し、かつ、マルトオリゴシルトレハロースシンターゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

【0010】

尚、トレハロース-6-リン酸シンターゼ活性とは、UDP-グルコースとグルコース 6-リン酸から α , α -トレハロース 6-リン酸と UDP への反応を触媒する活性を、マルトオリゴシルトレハロースシンターゼ活性とは、マルトペンタオースからマルトトリオシルトレハロースの反応を触媒する活性をいう。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のコリネ型細菌は、L-グルタミン酸生産能を有し、かつ、トレハロース合成能が低下又は欠失したコリネ型細菌である。

【0012】

本発明でいうコリネ型細菌としては、バーギーズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology) 第8版599頁 (1974) に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、孢子形成能を有しない桿菌であり、従来ブレビバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合された細菌を含み (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981))、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレビバクテリウム属細菌及びマイクロバクテリウム属細菌を含む。L-グルタミン酸の製造に好適に用いられるコリネ型細菌の菌株としては、例えば以下に示すものが挙げられる。

【0013】

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

コリネバクテリウム・アルカノリティカム

コリネバクテリウム・カルナエ

コリネバクテリウム・グルタミカム

コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

コリネバクテリウム・メラセコーラ

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス

コリネバクテリウム・ハーキュリス

ブレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレビバクテリウム・インマリオフィラム

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレビバクテリウム・ロゼウム

ブレビバクテリウム・サッカロリティカム

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス

ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス (コリネバクテリウム・アンモニアゲ)

ネス)

ブレビバクテリウム・アルバム

ブレビバクテリウム・セリヌム

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム

【0014】

具体的には、下記のような菌株を例示することができる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC13870

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806

コリネバクテリウム・アルカノリティカム ATCC21511

コリネバクテリウム・カルナエ ATCC15991

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020、13032、13

060

コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム) AT
CC15990

コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ12340 (FERM BP
-1539)

コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC13868

ブレビバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ATCC14020

ブレビバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム) AT
CC13826、ATCC14067

ブレビバクテリウム・インマリオフィラム ATCC14068

ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム (コリネバクテリウム・グルタミ
カム) ATCC13665、ATCC13869、

ブレビバクテリウム・ロゼウム ATCC13825

ブレビバクテリウム・サッカロリティカム ATCC14066

ブレビバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240

ブレビバクテリウム・アンモニアゲネス (コリネバクテリウム・アンモニアゲ

ネス) ATCC6871

ブレバクテリウム・アルバム ATCC15111

ブレバクテリウム・セリヌム ATCC15112

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム ATCC15354

【0015】

上記のようなコリネ型細菌のトレハロース合成能を低下又は欠失させることは、突然変異処理又は遺伝子組換え技術を利用して、トレハロース合成系酵素をコードする遺伝子を変異又は破壊することによって行うことができる。前記変異は、トレハロース合成系酵素をコードする遺伝子の転写又は翻訳を妨げる変異であってもよいし、活性の消失又は低下したトレハロース合成系酵素を産生するような変異であってもよい。トレハロース合成系酵素としては、トレハロース-6-リン酸シンターゼ、マルトオリゴシルトレハロースシンターゼ、又はこれらの両方が挙げられる。

【0016】

トレハロース合成系酵素をコードする遺伝子の破壊は、相同組換えを利用した遺伝子置換によって行うことができる。トレハロース合成系酵素をコードする遺伝子の一部を欠失し、トレハロース合成系酵素が正常に機能しないように改変した遺伝子（欠失型遺伝子）を含むDNAでコリネ型細菌を形質転換し、欠失型遺伝子と染色体上の正常遺伝子との間で組換えを起こさせることにより、染色体上の遺伝子を破壊することができる。このような相同組換えによる遺伝子破壊は既に確立しており、直鎖状もしくはコリネ型細菌中で複製しない環状のDNAを用いる方法や温度感受性複製開始点を含むプラスミドを用いる方法などがあるが、コリネ型細菌中で複製しない環状DNA、もしくは温度感受性複製開始点を含むプラスミドを用いる方法が好ましい。

【0017】

トレハロース合成系酵素をコードする遺伝子としては、例えば、otsA遺伝子、treY遺伝子又はこれらの両方の遺伝子が挙げられる。ブレバクテリウム・ラクトファーマメンタムのotsA遺伝子及びtreY遺伝子は、本発明によりそれらの遺伝子及びそれらの隣接領域の塩基配列が明らかにされたので、同配列に基づいてプライ

マーを作製し、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム染色体DNAを鋳型とするPCR（ポリメラーゼチェインリアクション：polymerase chain reaction；White, T.J. et al., Trends Genet., 5, 185 (1989) 参照）を行うことによって、容易に取得することができる。

【0018】

後記実施例で取得されたブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムのotsA遺伝子を含む塩基配列及びtreY遺伝子を含む塩基配列を、それぞれ配列番号29及び配列番号31に示す。また、これらの塩基配列がコードし得るアミノ酸配列を、それぞれ配列番号30及び配列番号32に示す。

【0019】

otsA遺伝子及びtreY遺伝子は、コードされるトレハロース-6-リン酸シンターゼ又はマルトオリゴシルトレハロースシンターゼの活性が損なわれない限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加を含む蛋白質をコードするものであってもよい。ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、好ましくは1～40個、より好ましくは1～20個、さらに好ましくは1～10個である。

【0020】

上記のようなトレハロース-6-リン酸シンターゼ又はマルトオリゴシルトレハロースシンターゼと実質的に同一の蛋白質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むように塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、トレハロース-6-リン酸シンターゼ又はマルトオリゴシルトレハロースシンターゼをコードするDNAをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及びトレハロース-6-リン酸シンターゼ又はマルトオリゴシルトレハロースシンターゼをコードするDNAを保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によっ

て処理する方法が挙げられる。

【0021】

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等には、トレハロース-6-リン酸シンターゼ又はマルトオリゴシルトレハロースシンターゼを保持する微生物の個体差、種や属の違いに基づく場合などの天然に生じる変異 (mutant又はvariant) も含まれる。

【0022】

上記のような変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現産物のトレハロース-6-リン酸シンターゼ活性又はマルトオリゴシルトレハロースシンターゼ活性を調べることにより、トレハロース-6-リン酸シンターゼ又はマルトオリゴシルトレハロースシンターゼと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。

【0023】

また、変異を有するトレハロース-6-リン酸シンターゼをコードするDNAまたはこれを保持する細胞から、例えば配列番号29に記載の塩基配列のうち、塩基番号484~1938からなる塩基配列を有するDNA、またはこの塩基配列から調製され得るプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、同塩基配列と55%以上、好ましくは65%以上、より好ましくは75%以上の相同性を有し、かつ、トレハロース-6-リン酸シンターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、トレハロース-6-リン酸シンターゼと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。同様に、変異を有するマルトオリゴシルトレハロースシンターゼをコードするDNAまたはこれを保持する細胞から、例えば配列番号31に記載の塩基配列のうち、塩基番号82~2514からなる塩基配列、またはこの塩基配列から調製され得るプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、同塩基配列と60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上の相同性を有し、かつ、マルトオリゴシルトレハロースシンターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、マルトオリゴシルトレハロースシンターゼと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。

【0024】

上記でいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば55%以上、好ましくは60%の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

【0025】

プローブとして、各遺伝子の一部の配列を用いることもできる。そのようなプローブは、各遺伝子の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、各遺伝子を含むDNA断片を鋳型とするPCR反応によって作製することができる。プローブとして、300bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件は、50℃、2×SSC、0.1%SDSが挙げられる。

【0026】

このような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の活性発現ベクターにつなぎ、トレハロース-6-リン酸シンターゼ活性又はマルトオリゴシルトレハロースシンターゼ活性を測定することによって容易に取り除くことができる。

【0027】

尚、otsA遺伝子又はtreY遺伝子を、コリネ型細菌の染色体上のこれらの遺伝子の破壊に用いる場合は、コードされるトレハロース-6-リン酸シンターゼ又はマルトオリゴシルトレハロースシンターゼが活性を有する必要はない。また、遺伝子破壊に用いるotsA遺伝子又はtreY遺伝子は、コリネ型細菌のこれらの遺伝子との相同組換えが可能である限り、他の微生物に由来する遺伝子であってもよい。例えば、エシェリヒア属細菌又はマイコバクテリウム属細菌のotsA遺伝子、ア

ースロバクター属細菌、ブレビバクテリウム・ヘルボルム、又はリゾビウム属細菌のtreY遺伝子が挙げられる。

【0028】

otsA遺伝子もしくはtreY遺伝子又はこれらの一部を含むDNA断片から、一定の領域を制限酵素により切り出し、コード領域又はプロモーター等の発現調節配列の少なくとも一部を欠失させることによって、欠失型遺伝子を作製することができる。

【0029】

また、遺伝子の一部を欠失するように設計したプライマーを用いてPCRを行うことによって、欠失型遺伝子を取得することができる。さらに、欠失型遺伝子は、一塩基変異、例えばフレームシフト変異によるものであってもよい。

【0030】

以下に、otsA遺伝子の遺伝子破壊について説明するが、treY遺伝子の遺伝子破壊も同様にして行うことができる。

欠失型otsA遺伝子を、宿主染色体上のotsA遺伝子と置換するには以下のようにすればよい。すなわち、コリネ型細菌中で自律複製できないプラスミドに、欠失型otsA遺伝子と、カナマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン等の薬剤に耐性を示すマーカー遺伝子とを挿入して、組換えDNAを調製し、この組換えDNAでコリネ型細菌を形質転換し、形質転換株を薬剤を含む培地で培養することにより、組換えDNAが染色体DNAに組み込まれた形質転換株が得られる。また、プラスミドとして、温度感受性プラスミドを用い、形質転換株を温度感受性プラスミドが複製できない温度で培養してもよい。

【0031】

上記のようにして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上にもともと存在するotsA遺伝子配列との組換えを起こし、染色体otsA遺伝子と欠失型otsA遺伝子との融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分（ベクター部分及び薬剤耐性マーカー）を挟んだ状態で染色体に挿入されている。

【0032】

次に、染色体DNA上に欠失型otsA遺伝子のみを残すために、2個のotsA遺伝

子の組換えにより1コピーのotsA遺伝子を、ベクター部分（薬剤耐性マーカを含む）とともに染色体DNAから脱落させる。その際、正常なotsA遺伝子が染色体DNA上に残され、欠失型otsA遺伝子が切り出される場合と、反対に欠失型otsA遺伝子が染色体DNA上に残され、正常なotsA遺伝子が切り出される場合がある。いずれの遺伝子が染色体DNA上に残されたかは、染色体上のotsA遺伝子の構造をPCR又はハイブリダイゼーション等で調べることによって、確認することができる。

【0033】

本発明に用いるコリネ型細菌は、トレハロース合成能が低下又は欠失したことに加えて、L-グルタミン酸生合成を触媒する酵素の活性が増強されていてもよい。このようなL-グルタミン酸生合成を触媒する酵素としては、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、グルタミンシンターゼ、グルタミン酸シンターゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、アコニット酸ヒドラターゼ、クエン酸シンターゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ、エノラーゼ、ホスホグリセロムターゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、フルトースビスリン酸アルドラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコースリン酸イソメラーゼ等がある。

【0034】

また、本発明に用いるコリネ型細菌は、L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下あるいは欠損されていてもよい。このような酵素としては、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ、イソクエン酸リアーゼ、リン酸アセチルトランスフェラーゼ、酢酸キナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、アセト乳酸シンターゼ、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、L-グルタミン酸デカルボキシラーゼ、1-ピロリン酸デヒドロゲナーゼ等が挙げられる。

【0035】

さらに、L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌に、界面活性剤等のピオチン作用抑制物質に対する温度感受性変異を付与することにより、過剰量のピ

オチンを含有する培地中にてビオチン作用抑制物質の非存在下でL-グルタミン酸を生産させることができる(W096/06180号参照)。このようなコリネ型細菌としては、W096/06180号に記載されているブレヴィバクテリウム・ラクトファーマータムAJ13029が挙げられる。AJ13029株は、1994年9月2日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号FERM P-14501として寄託され、1995年8月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM BP-5189が付与されている。

【0036】

L-グルタミン酸生産能を有し、かつ、トレハロース合成能が低下又は欠失したコリネ型細菌を好適な培地で培養すれば、L-グルタミン酸が培地に蓄積する。

L-グルタミン酸を製造するのに用いる培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機微量栄養素を含有する通常の培地である。炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトース、シュクロース、マルトース、蔗糖蜜、澱粉加水分解物などの炭水化物、エタノールやイノシトールなどのアルコール類、酢酸、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。

【0037】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、アンモニア、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、酵母エキス、コーン・ステープ・リカー、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

【0038】

無機イオンとしては、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。有機微量栄養素としては、ビタミンB₁などの要求物質または酵母エキス等を必要に応じ適量含有させることが望ましい。

【0039】

培養は、振とう培養、通気攪拌培養等による好氣的条件下で16～72時間実

施するのがよく、培養温度は30℃～45℃に、培養中pHは5～9に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。

【0040】

発酵液からのL-グルタミン酸の採取は、例えばイオン交換樹脂法、晶析法等によることができる。具体的には、L-グルタミン酸を陰イオン交換樹脂により吸着、分離させるか、または中和晶析させればよい。

【0041】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0042】

【実施例1】 ブレバクテリウム・ラクトファーメンタムのotsA遺伝子破壊株の構築

<1>otsA遺伝子のクローニング

ブレバクテリウムラクトファーメンタムのotsA遺伝子は知られていないため、他の微生物のotsA遺伝子の塩基配列を利用して、その取得を行った。これまでに、エシェリヒア属、マイコバクテリウム属のotsA遺伝子は全塩基配列が明らかにされている(Kaasen, I., et al., Gene, 145(1), 9-15 (1994); De Smet K.A., et al., Microbiology, 146(1), 199-208 (2000))。そこでまず、これらの塩基配列から推定されるアミノ酸配列を参考にして、PCR法のためのDNAプライマーP1(配列番号1)、P2(配列番号2)を合成した。DNAプライマーP1、P2は、それぞれエシェリヒア・コリのotsA遺伝子の塩基配列(GenBank accession X69160)における塩基番号1894から1913番目、2531から2549番目の位置に相当する。一方、マイコバクテリウム・ツベルクロシスのotsA遺伝子(GenBank accession Z95390)においては、塩基番号40499～40518、41166～41184の位置に相当する。

【0043】

続いてプライマーP1とP2を用いて、ブレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869の染色体DNAを鋳型として、94℃ 0.5分、50℃ 0.5分、72℃ 4分の反応30サイクルのPCRを行った。その結果、およそ0.6Kbpのほぼ単一の増幅断片

を取得した。この増幅断片を、Invitrogen社製の「Original TA cloning Kit」を用いて、プラスミドベクターpCR2.1にクローニングし、pCotsAを得た。続いて、クローニング断片の塩基配列を決定した。

【0044】

以上のようにして取得したotsA遺伝子の部分断片の塩基配列をもとに、新たにDNAプライマーP10（配列番号8）、P12（配列番号10）を合成し、「inverse PCR」(Triglia, T. et al., Nucleic Acids Res., 16, 81-86 (1988), Ochman, H., et al., Genetics, 120, 621-623 (1988))により、前記部分断片に隣接する未知領域を増幅した。ブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタム ATCC13869の染色体DNAを制限酵素BamHI, BglIII, ClaI, HindIII, KpnI, MluI, MunI, Sall, XhoIにより切断後、T4 DNAリガーゼ（宝酒造（株）製）を用いて分子内結合させたものを鋳型として、DNAプライマーP10、P12を用いて、94℃ 0.5分、55℃ 1分、72℃ 4分の反応30サイクルのPCRを行った。その結果、制限酵素としてClaIおよびBglIIIを使用した場合に、それぞれ4Kbp、4Kbpの増幅断片を得た。この増幅断片を、DNAプライマーP5～9（配列番号3～7）、P11～15（配列番号9～13）を用いて直接塩基配列を決定し、配列番号29に示すようなブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタム ATCC13869のotsA遺伝子の全塩基配列を決定した。同塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を、配列番号29及び30に示す。

【0045】

前記otsA遺伝子の配列と、前記エシェリヒア・コリのotsA遺伝子（GenBank accession X69160）、及びマイコバクテリウム・ツベルクロシスのotsA遺伝子（GenBank accession Z95390）の配列との相同性を調べたところ、塩基配列では各々46.3%、55.9%であり、アミノ酸配列では各々30.9%、51.7%であった。尚、相同性の算出は、プログラムとしてLipman-Person法（Science, 227, 1435-1441 (1985)）を用い、ソフトウェア「GENETIX-WIN」（ソフトウェア開発（株））を用いて行った。

【0046】

<2>otsA遺伝子破壊用プラスミドの作製

コリネ型細菌のトレハロース生合成系酵素遺伝子破壊による、L-グルタミン

酸生産性向上効果の有無を検討するために、otsA遺伝子破壊プラスミドの作製を行った。otsA遺伝子破壊用プラスミドの作製は、以下のようにして行った。先のotsA遺伝子のクローニングの際に構築したプラスミドpCotsAを鋳型として、ClaIサイトを挿入したプライマーP29（配列番号33）とP30（配列番号34）を用いて、94℃ 0.5分、55℃ 0.5分、72℃ 8分の反応30サイクルのPCRを行った。増幅断片をClaIで処理し、T4 DNAポリメラーゼ（宝酒造（株）製）を用いて平滑末端処理を行った後、T4 DNAリガーゼ（宝酒造（株）製）を用いて分子内結合させ、otsA遺伝子のほぼ中央部にフレームシフト変異（配列番号29において1258～1300番目の塩基が欠失）が導入されたプラスミドpCotsACを構築した。

【0047】

<3>otsA遺伝子破壊株の作製

遺伝子破壊用プラスミドpCotsACを用いて、L-グルタミン酸生産菌ブレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869を電気パルス法により形質転換し、カナマイシンを20mg/L含有したCM2B培地にて生育できることを指標に、形質転換体を取得した。このotsA遺伝子破壊用プラスミドpCotsACは、ブレバクテリウム・ラクトファーマンタム中で機能する複製起点を有さないため、同プラスミドによって得られる形質転換体はブレバクテリウム・ラクトファーマンタム染色体上のotsA遺伝子と、遺伝子破壊用プラスミドpCotsACとが相同組換えを起こしたものである。こうして得られた相同組換え株より、再度相同組換えを起こしたことによって、遺伝子破壊用プラスミドpCotsACのベクター部分が除去された株を、カナマイシンに対して感受性となったことを指標に取得した。

【0048】

上記のようにして得られた株の中から、目的のフレームシフト変異が導入された株を選択した。このような菌株の選択は、カナマイシン感受性となった菌株より抽出した染色体DNAを鋳型として、DNAプライマーP8（配列番号14）とP13（配列番号11）を用いて、94℃ 0.5分、55℃ 0.5分、72℃ 1分の反応30サイクルのPCRを行い、得られた増幅断片をDNAプライマーP8を用いて塩基配列の決定を行い、フレームシフト変異が導入され、otsA遺伝子が機能しなくなっていることを確認することによって行った。以上のようにして得られた菌株を、ΔOA株と命名

した。

【0049】

【実施例2】 treY遺伝子破壊株の構築

<1>treY遺伝子のクローニング

ブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタムのtreY遺伝子は知られていないために、他の微生物のtreY遺伝子の塩基配列を利用して、その取得を行った。これまでに、アースロバクター属、ブレビバクテリウム属、リゾビウム属のtreY遺伝子は塩基配列が明らかにされている (Maruta, K., et al., Biochim. Biophys. Acta, 1289(1), 10-13 (1996); Genbank accession AF039919; Maruta, K., et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 60(4), 717-720 (1996))。そこでまず、これらの塩基配列から推定されるアミノ酸配列を参考にしてPCR法のためのDNAプライマーP3 (配列番号14)、P4 (配列番号15) を合成した。DNAプライマーP3、P4はそれぞれアースロバクター・スピーシーズのtreY遺伝子 (GenBank accession D63343) の塩基配列における塩基番号975~992、2565~2584の位置に相当する。また、ブレビバクテリウム・ヘルボルムのtreY遺伝子 (GenBank accession AF039919) の塩基配列においては、塩基番号893~910、2486~2505の位置に相当する。一方、リゾビウム・スピーシーズのtreY遺伝子 (GenBank accession D78001) の塩基配列においては、塩基番号862~879、2452~2471の位置に相当する。

【0050】

続いてプライマーP3とP4を用いて、ブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタム ATCC13869の染色体DNAを鋳型として、94℃ 0.5分、55℃ 0.5分、72℃ 2分の反応30サイクルのPCRを行った。その結果、およそ1.6Kbpのほぼ単一の増幅断片を取得した。この増幅断片をInvitrogen社製の「Oriinal TA cloning Kit」を用いてプラスミドベクターpCR2.1にクローニングし、続いて約0.6Kbの塩基配列を決定した。

【0051】

以上のようにして取得したtreY遺伝子の部分断片の塩基配列をもとに、新たにDNAプライマーP16 (配列番号16)、P26 (配列番号26) を合成し、「inverse

PCR] (Triglia, T., et al. *Nucleic Acids Res.*, 16, 81-86 (1988), Ochman, H., et al., *Genetics*, 120, 621-623 (1988)) により、前記部分断片に隣接する未知領域を増幅した。ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869 の染色体を制限酵素 BamHI, HindIII, SalI, XhoI により切断後、T4 DNA リガーゼ (宝酒造 (株) 製) を用いて分子内結合させたものを鋳型として、DNA プライマー P16、P26 を用いて、94℃ 0.5 分、55℃ 1 分、72℃ 4 分の反応 30 サイクルの PCR を行った。その結果、制限酵素として HindIII および SalI を使用した場合に、それぞれ 0.6 Kbp、1.5 Kbp の増幅断片を得た。この増幅断片を DNA プライマー P16~28 (配列番号 16~28) を用いて直接塩基配列を決定し、配列番号 31 に示すようなブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869 の *treY* 遺伝子の全塩基配列を決定した。同塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を、配列番号 31 及び 32 に示す。

【0052】

前記 *treY* 遺伝子の配列と、前記アースロバクター・スピーシーズの *treY* 遺伝子 (GenBank accession D63343)、ブレビバクテリウム・ヘルボルムの *treY* 遺伝子 (GenBank accession AF039919)、及びリゾビウム・スピーシーズの *treY* 遺伝子 (GenBank accession D78001) の配列との相同性を調べたところ、塩基配列では各々 52.0%、52.3%、51.9% であり、アミノ酸配列では各々 40.9%、38.5%、39.8% であった。尚、相同性の算出は、プログラムとして Lipman-Person 法 (*Science*, 227, 1435-1441 (1985)) を使い、ソフトウェア「GENETIX-WIN」(ソフトウェア開発 (株)) を用いて行った。

【0053】

<2> *treY* 遺伝子破壊用プラスミドの作製

コリネ型細菌のトレハロース生合成系酵素遺伝子破壊による、L-グルタミン酸生産性向上効果の有無を検討するために、*treY* 遺伝子破壊プラスミドの作製を行った。まず、DNA プライマー P17 (配列番号 17) と P25 (配列番号 25) を用いて、ATCC13869 の染色体 DNA を鋳型にして、94℃ 0.5 分、60℃ 0.5 分、72℃ 2 分の反応 30 サイクルの PCR を行った。増幅断片を EcoRI で消化し、EcoRI で処理した p HSG299 (宝酒造 (株) 製) と T4 DNA リガーゼ (宝酒造 (株) 製) を用いて結合さ

せ、プラスミドpHtreYを取得した。さらに、このpHtreYをAflIII（宝酒造（株）製）で処理し、T4 DNAポリメラーゼ（宝酒造（株）製）を用いて平滑末端処理を行った後、T4 DNAリガーゼ（宝酒造（株）製）を用いて分子内結合させ、treY遺伝子のほぼ中央部にフレームシフト変異（配列番号31において1145番目の後ろに4塩基挿入）が導入されたプラスミドpHtreYAを構築した。

【0054】

＜3＞treY遺伝子破壊株の作製

遺伝子破壊用プラスミドpCtreYAを用いて、L-グルタミン酸生産菌ブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタム ATCC13869を電気パルス法により形質転換し、カナマイシンを20mg/L含有したCM2B培地にて生育できることを指標に、形質転換体を取得した。このtreY遺伝子破壊用プラスミドpCtreYAは、ブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタム中で機能する複製起点を有さないため、同プラスミドによって得られる形質転換体はブレビバクテリウム・ラクトファーマメンタム染色体上のtreY遺伝子と、遺伝子破壊用プラスミドpCtreYAとが相同組換えを起こしたものである。こうして得られた相同組換え株より、再度相同組換えを起こしたことによって、遺伝子破壊用プラスミドpCtreYAのベクター部分が除去された株を、カナマイシンに対して感受性となったことを指標に取得した。

【0055】

上記のようにして得られた株の中から、目的のフレームシフト変異が導入された株を選択した。このような菌株の選択は、DNAプライマーP19（配列番号19）とP25（配列番号25）を用いて、94℃ 0.5分、55℃ 0.5分、72℃ 1.5分の反応30サイクルのPCRを行い、得られた断片をDNAプライマーP21またはP23を用いて塩基配列の決定を行い、フレームシフト変異が導入され、treY遺伝子が機能しなくなっていることを確認することによって行った。以上のようにして得られた菌株を、 Δ TA株と命名した。

【0056】

【実施例3】 Δ OA株及び Δ TA株のL-グルタミン酸生産能の評価

ATCC13869株、 Δ OA株及び Δ TA株のL-グルタミン酸の生産培養を、以下の様に行った。これらの菌株をCM2Bプレート培地にて培養してリフレッシュを行い、

リフレッシュされた各菌株を、グルコース 80 g、 KH_2PO_4 1 g、 MgSO_4 0.4 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g、大豆加水分解液 15ml、サイアミン塩酸塩 $200 \mu\text{g}$ 、ビオチン $3 \mu\text{g}$ 、及び CaCO_3 50 gを純水 1L中に含む培地（KOHを用いてpHは8.0に調整されている）において、 31.5°C にて培養した。培養後に培地中のL-グルタミン酸の蓄積量、及び51倍希釈した培養液の620nmにおける吸光度を測定した結果を、表1に示す。

【0057】

otsA遺伝子又はtreY遺伝子を破壊したブレヴィバクテリウム・ラクトファーマータムは、親株と同程度の生育を示す一方、L-グルタミン酸生産量は親株に比べて増大した。

【0058】

【表1】

表 1

| 菌株 | $\text{OD}_{620}(\times 51)$ | L-グルタミン酸 (g/l) | 収率 (%) |
|-------------------|------------------------------|-------------------|-----------|
| ATCC13869 | 0.930 | 40.2 | 48.4 |
| ΔOA | 1.063 | 43.8 | 52.8 |
| ΔTA | 0.850 | 45.6 | 54.9 |

【0059】

〔配列表の説明〕

配列番号1：otsA増幅用プライマーP1

配列番号2：otsA増幅用プライマーP2

配列番号3：プライマーP5

配列番号4：プライマーP6

配列番号5：プライマーP7

配列番号6：プライマーP8

- 配列番号7 : プライマーP9
- 配列番号8 : プライマーP10
- 配列番号9 : プライマーP11
- 配列番号10 : プライマーP12
- 配列番号11 : プライマーP13
- 配列番号12 : プライマーP14
- 配列番号13 : プライマーP15
- 配列番号14 : treY増幅用プライマーP3
- 配列番号15 : treY増幅用プライマーP4
- 配列番号16 : プライマーP16
- 配列番号17 : プライマーP17
- 配列番号18 : プライマーP18
- 配列番号19 : プライマーP19
- 配列番号20 : プライマーP20
- 配列番号21 : プライマーP21
- 配列番号22 : プライマーP22
- 配列番号23 : プライマーP23
- 配列番号24 : プライマーP24
- 配列番号25 : プライマーP25
- 配列番号26 : プライマーP26
- 配列番号27 : プライマーP27
- 配列番号28 : プライマーP28
- 配列番号29 : otsA遺伝子塩基配列
- 配列番号30 : OtsAアミノ酸配列
- 配列番号31 : treY遺伝子塩基配列
- 配列番号32 : TreYアミノ酸配列
- 配列番号33 : プライマーP29
- 配列番号34 : プライマーP30

【0060】

【発明の効果】

本発明によれば、コリネ型細菌を用いた発酵法によるＬーグルタミン酸の製造において、トレハロースの副生を抑制し、Ｌーグルタミン酸の生産効率を向上させることができる。

【 0 0 6 1 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc. (味の素株式会社)

<120> Ｌーグルタミン酸生産菌及びＬーグルタミン酸の製造法

<130> P-7468

<140>

<141> 2000-07-05

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.0

【 0 0 6 2 】

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<220>

<221> misc_feature

<222> (3,9,18)

<223> n=a or g or c or t

<400> 1

canathggnt tyttytnca

20

【 0 0 6 3 】

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<220>

<221> misc_feature

<222> (3,11,19)

<223> n=a or g or c or t

<400> 2

canarrttca tncrctnc

19

【 0 0 6 4 】

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 3

gaatcatcca tataagatcc ggc

23

【 0 0 6 5 】

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 4

tagctttgta gttgttgcta accg

24

【 0 0 6 6 】

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 5

agcgaacttg aggtttactt cccg

24

【 0 0 6 7 】

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 6

tgctggttcc tggcattttg cgcc

24

【 0 0 6 8 】

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 7

tcgaacaatc tcttcacgcc

20

【 0 0 6 9 】

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 8

gaatcccacc aaatctgcgc c

21

【 0 0 7 0 】

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 9

tgatgttgaa atgtttgggg

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 10

gatgtcatgc tggttacgcc

20

【 0 0 7 1 】

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 11

caaagcacca gtgccgtcgc gg

22

【 0 0 7 2 】

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 12

tgttcgtttt cattcgcggt gccg

24

【 0 0 7 3 】

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 13

atagtttcct ggattgtttg gcgc

24

【 0 0 7 4 】

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)

<223> n=a or g or c or t

<400> 14

caraaycct ggtggtgg

18

【 0 0 7 5 】

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<220>

<221> misc_feature

<222> (3,6,15)

<223> n=a or g or c or t

<400> 15

ggncgncgrt trtcnggrtc

20

【 0 0 7 6 】

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 16

cgagctcttc attgatggcg

20

【 0 0 7 7 】

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 17

gcagctacac acgagttggg

20

【 0 0 7 8 】

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 18

gcaacaccta aatggttggg

20

【 0 0 7 9 】

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 19

gcaagaagtc tacaagcgcc

20

【 0 0 8 0 】

<210> 20

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 20

gccaacgtat tcacgg

16

【 0 0 8 1 】

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 21

tgatgaacca ctcgatcccc

20

【 0 0 8 2 】

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 22

aagacaccac cttctaccgc

20

【 0 0 8 3 】

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 23

caagtggaat tctgcagcgg

20

【 0 0 8 4 】

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 24

cctcctacaa aacctgctgg g

21

【 0 0 8 5 】

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 25

tcgcggatag cttttagggc

20

【 0 0 8 6 】

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 26

tgagttttta gaagactccc

20

【 0 0 8 7 】

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 27

cgcttcagtg gtgttgtccc

20

【 0 0 8 8 】

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 28

cgtaccactc cacggaaatt cccg

24

【 0 0 8 9 】

<210> 29

<211> 2369

<212> DNA

<213> *Brevibacterium lactofermentum*

<220>

<221> CDS

<222> (484)..(1938)

<400> 29

acagaatcag cgccggcaga gaaacgtcca aagactaatc agagattcgg tataaaggta 60
 aaaatcaacc tgcttaggcg tctttcgctt aaatagcgta gaatatcggg tcgatcgctt 120
 ttaaacactc aggaggatcc ttgccggcca aaatcacgga cactcgtccc accccagaat 180
 cccttcacgc tgttgaagag gaaaccgcag ccggtgcccg caggattgtt gccacctatt 240
 ctaaggactt cttcgacggc gtcactttga tgtgcatgct cggcgttgaa cctcagggcc 300
 tgcgttacac caaggtcgct tctgaacacg aggaagctca gccaaagaag gctacaaagc 360
 ggactcgtaa ggctaccagc taagaaggct gctgctaaga aaacgaccaa gaagaccact 420
 aagaaaacta ctaaaaagac caccgcaaag aagaccacaa agaagtctta agccggatct 480
 tat atg gat gat tcc aat agc ttt gta gtt gtt gct aac cgt ctg cca 528

Met Asp Asp Ser Asn Ser Phe Val Val Val Ala Asn Arg Leu Pro

1 5 10 15
 gtg gat atg act gtc cac cca gat ggt agc tat agc atc tcc ccc agc 576

Val Asp Met Thr Val His Pro Asp Gly Ser Tyr Ser Ile Ser Pro Ser

20 25 30
 ccc ggt ggc ctt gtc acg ggg ctt tcc ccc gtt ctg gaa caa cat cgt 624
 Pro Gly Gly Leu Val Thr Gly Leu Ser Pro Val Leu Glu Gln His Arg

35 40 45
 gga tgt tgg gtc gga tgg cct gga act gta gat gtt gca ccc gaa cca 672
 Gly Cys Trp Val Gly Trp Pro Gly Thr Val Asp Val Ala Pro Glu Pro

50 55 60
 ttt cga aca gat acg ggt gtt ttg ctg cac cct gtt gtc ctc act gca 720
 Phe Arg Thr Asp Thr Gly Val Leu Leu His Pro Val Val Leu Thr Ala

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 65 | 70 | 75 | |
| agt gac tat gaa ggc ttc tac gag ggc ttt tca aac gca acg ctg tgg | | | 768 |
| Ser Asp Tyr Glu Gly Phe Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Ala Thr Leu Trp | | | |
| 80 | 85 | 90 | 95 |
| cct ctt ttc cac gat ctg att gtt act ccg gtg tac aac acc gat tgg | | | 816 |
| Pro Leu Phe His Asp Leu Ile Val Thr Pro Val Tyr Asn Thr Asp Trp | | | |
| 100 | 105 | 110 | |
| tgg cat gcg ttt cgg gaa gta aac ctc aag ttc gct gaa gcc gtg agc | | | 864 |
| Trp His Ala Phe Arg Glu Val Asn Leu Lys Phe Ala Glu Ala Val Ser | | | |
| 115 | 120 | 125 | |
| caa gtg gcg gca cac ggt gcc act gtg tgg gtg cag gac tat cag ctg | | | 912 |
| Gln Val Ala Ala His Gly Ala Thr Val Trp Val Gln Asp Tyr Gln Leu | | | |
| 130 | 135 | 140 | |
| ttg ctg gtt cct ggc att ttg cgc cag atg cgc ctt gat ttg aag atc | | | 960 |
| Leu Leu Val Pro Gly Ile Leu Arg Gln Met Arg Leu Asp Leu Lys Ile | | | |
| 145 | 150 | 155 | |
| ggg ttc ttc ctc cac att ccc ttc cct tcc cct gat ctg ttc cgt cag | | | 1008 |
| Gly Phe Phe Leu His Ile Pro Phe Pro Ser Pro Asp Leu Phe Arg Gln | | | |
| 160 | 165 | 170 | 175 |
| ctg ccg tgg cgt gaa gag att gtt cga ggc atg ctg ggc gca gat ttg | | | 1056 |
| Leu Pro Trp Arg Glu Glu Ile Val Arg Gly Met Leu Gly Ala Asp Leu | | | |
| 180 | 185 | 190 | |
| gtg gga ttc cat ttg gtt caa aac gca gaa aac ttc ctt gcg tta acc | | | 1104 |
| Val Gly Phe His Leu Val Gln Asn Ala Glu Asn Phe Leu Ala Leu Thr | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| cag cag gtt gcc ggc act gcc ggg tct cat gtg ggt cag ccg gac acc | | | 1152 |
| Gln Gln Val Ala Gly Thr Ala Gly Ser His Val Gly Gln Pro Asp Thr | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| ttg cag gtc agt ggt gaa gca ttg gtg cgt gag att ggc gct cat gtt | | | 1200 |

Leu Gln Val Ser Gly Glu Ala Leu Val Arg Glu Ile Gly Ala His Val
 225 230 235
 gaa acc gct gac gga agg cga gtt agc gtc ggg gcg ttc ccg atc tcg 1248
 Glu Thr Ala Asp Gly Arg Arg Val Ser Val Gly Ala Phe Pro Ile Ser
 240 245 250 255
 att gat gtt gaa atg ttt ggg gag gcg tcg aaa agc gcc gtt ctt gat 1296
 Ile Asp Val Glu Met Phe Gly Glu Ala Ser Lys Ser Ala Val Leu Asp
 260 265 270
 ctt tta aaa acg ctc gac gag ccg gaa acc gta ttc ctg ggc gtt gac 1344
 Leu Leu Lys Thr Leu Asp Glu Pro Glu Thr Val Phe Leu Gly Val Asp
 275 280 285
 cga ctg gac tac acc aag ggc att ttg cag cgc ctg ctt gcg ttt gag 1392
 Arg Leu Asp Tyr Thr Lys Gly Ile Leu Gln Arg Leu Leu Ala Phe Glu
 290 295 300
 gaa ctg ctg gaa tcc ggc gcg ttg gag gcc gac aaa gct gtg ttg ctg 1440
 Glu Leu Leu Glu Ser Gly Ala Leu Glu Ala Asp Lys Ala Val Leu Leu
 305 310 315
 cag gtc gcg acg cct tcg cgt gag cgc att gat cac tat cgt gtg tcg 1488
 Gln Val Ala Thr Pro Ser Arg Glu Arg Ile Asp His Tyr Arg Val Ser
 320 325 330 335
 cgt tcg cag gtc gag gaa gcc gtc ggc cgt atc aat ggt cgt ttc ggt 1536
 Arg Ser Gln Val Glu Glu Ala Val Gly Arg Ile Asn Gly Arg Phe Gly
 340 345 350
 cgc atg ggg cgt ccc gtg gtg cat tat cta cac agg tca ttg agc aaa 1584
 Arg Met Gly Arg Pro Val Val His Tyr Leu His Arg Ser Leu Ser Lys
 355 360 365
 aat gat ctc cag gtg ctg tat acc gca gcc gat gtc atg ctg gtt acg 1632
 Asn Asp Leu Gln Val Leu Tyr Thr Ala Ala Asp Val Met Leu Val Thr
 370 375 380

cct ttt aaa gac ggt atg aac ttg gtg gct aaa gaa ttc gtg gcc aac 1680
 Pro Phe Lys Asp Gly Met Asn Leu Val Ala Lys Glu Phe Val Ala Asn
 385 390 395
 cac cgc gac ggc act ggt gct ttg gtg ctg tcc gaa ttt gcc ggc gcg 1728
 His Arg Asp Gly Thr Gly Ala Leu Val Leu Ser Glu Phe Ala Gly Ala
 400 405 410 415
 gcc act gag ctg acc ggt gcg tat tta tgc aac cca ttt gat gtg gaa 1776
 Ala Thr Glu Leu Thr Gly Ala Tyr Leu Cys Asn Pro Phe Asp Val Glu
 420 425 430
 tcc atc aaa cgg caa atg gtg gca gct gtc cat gat ttg aag cac aat 1824
 Ser Ile Lys Arg Gln Met Val Ala Ala Val His Asp Leu Lys His Asn
 435 440 445
 ccg gaa tct gcg gca acg cga atg aaa acg aac agc gag cag gtc tat 1872
 Pro Glu Ser Ala Ala Thr Arg Met Lys Thr Asn Ser Glu Gln Val Tyr
 450 455 460
 acc cac gac gtc aac gtg tgg gct aat agt ttc ctg gat tgt ttg gcg 1920
 Thr His Asp Val Asn Val Trp Ala Asn Ser Phe Leu Asp Cys Leu Ala
 465 470 475
 cag tcg gga gaa aac tca tgaaccgcgc acgaatcgcg accataggcg 1968
 Gln Ser Gly Glu Asn Ser
 480 485
 ttcttccgct tgctttactg ctggcgtcct gtggttcaga caccgtggaa atgacagatt 2028
 ccacctggtt ggtgaccaat atttacaccg atccagatga gtcgaattcg atcagtaatc 2088
 ttgtcatttc ccagcccagc ttagattttg gcaattcttc cctgtctggt ttcactggct 2148
 gtgtgccttt tacggggcgt gcggaattct tccaaaatgg tgagcaaagc tctgttctgg 2208
 atgccgatta tgtgaccttg tcttccttgg atttcgataa acttcccgat gattgccaag 2268
 gacaagaact caaagttcat aacgagctgg ttgatcttct gcctggttct tttgaaatct 2328
 ccaggacttc tgggttcagaa atcttgctga ctagcgatgt c 2369

【0090】

<210> 30

<211> 485

<212> PRT

<213> *Brevibacterium lactofermentum*

<400> 30

Met Asp Asp Ser Asn Ser Phe Val Val Val Ala Asn Arg Leu Pro Val

1 5 10 15

Asp Met Thr Val His Pro Asp Gly Ser Tyr Ser Ile Ser Pro Ser Pro

20 25 30

Gly Gly Leu Val Thr Gly Leu Ser Pro Val Leu Glu Gln His Arg Gly

35 40 45

Cys Trp Val Gly Trp Pro Gly Thr Val Asp Val Ala Pro Glu Pro Phe

50 55 60

Arg Thr Asp Thr Gly Val Leu Leu His Pro Val Val Leu Thr Ala Ser

65 70 75 80

Asp Tyr Glu Gly Phe Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Ala Thr Leu Trp Pro

85 90 95

Leu Phe His Asp Leu Ile Val Thr Pro Val Tyr Asn Thr Asp Trp Trp

100 105 110

His Ala Phe Arg Glu Val Asn Leu Lys Phe Ala Glu Ala Val Ser Gln

115 120 125

Val Ala Ala His Gly Ala Thr Val Trp Val Gln Asp Tyr Gln Leu Leu

130 135 140

Leu Val Pro Gly Ile Leu Arg Gln Met Arg Leu Asp Leu Lys Ile Gly

145 150 155 160

Phe Phe Leu His Ile Pro Phe Pro Ser Pro Asp Leu Phe Arg Gln Leu

165 170 175

Pro Trp Arg Glu Glu Ile Val Arg Gly Met Leu Gly Ala Asp Leu Val

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 180 | 185 | 190 | |
| Gly Phe His Leu Val Gln Asn Ala Glu Asn Phe Leu Ala Leu Thr Gln | | | |
| 195 | 200 | 205 | |
| Gln Val Ala Gly Thr Ala Gly Ser His Val Gly Gln Pro Asp Thr Leu | | | |
| 210 | 215 | 220 | |
| Gln Val Ser Gly Glu Ala Leu Val Arg Glu Ile Gly Ala His Val Glu | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Thr Ala Asp Gly Arg Arg Val Ser Val Gly Ala Phe Pro Ile Ser Ile | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| Asp Val Glu Met Phe Gly Glu Ala Ser Lys Ser Ala Val Leu Asp Leu | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| Leu Lys Thr Leu Asp Glu Pro Glu Thr Val Phe Leu Gly Val Asp Arg | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| Leu Asp Tyr Thr Lys Gly Ile Leu Gln Arg Leu Leu Ala Phe Glu Glu | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| Leu Leu Glu Ser Gly Ala Leu Glu Ala Asp Lys Ala Val Leu Leu Gln | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| Val Ala Thr Pro Ser Arg Glu Arg Ile Asp His Tyr Arg Val Ser Arg | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| Ser Gln Val Glu Glu Ala Val Gly Arg Ile Asn Gly Arg Phe Gly Arg | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| Met Gly Arg Pro Val Val His Tyr Leu His Arg Ser Leu Ser Lys Asn | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| Asp Leu Gln Val Leu Tyr Thr Ala Ala Asp Val Met Leu Val Thr Pro | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| Phe Lys Asp Gly Met Asn Leu Val Ala Lys Glu Phe Val Ala Asn His | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| Arg Asp Gly Thr Gly Ala Leu Val Leu Ser Glu Phe Ala Gly Ala Ala | | | |
| 405 | 410 | 415 | |

Thr Glu Leu Thr Gly Ala Tyr Leu Cys Asn Pro Phe Asp Val Glu Ser

420

425

430

Ile Lys Arg Gln Met Val Ala Ala Val His Asp Leu Lys His Asn Pro

435

440

445

Glu Ser Ala Ala Thr Arg Met Lys Thr Asn Ser Glu Gln Val Tyr Thr

450

455

460

His Asp Val Asn Val Trp Ala Asn Ser Phe Leu Asp Cys Leu Ala Gln

465

470

475

480

Ser Gly Glu Asn Ser

485

【 0 0 9 1 】

<210> 31

<211> 2956

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (82)..(2514)

<220>

<221> misc_feature

<222> (2953)

<223> n=a or g or c or t

<400> 31

ttttccacg cagggaaggc gtgaacacta agatcgagga cgtaccgcac gattttgcct 60

aacttttaag ggtgtttcat c atg gca cgt cca att tcc gca acg tac agg 111

Met Ala Arg Pro Ile Ser Ala Thr Tyr Arg

| | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 5 | 10 | |
| ctt caa atg cga gga cct caa gca gat agc gcc ggg cgt ttc ttt ggt | | | | 159 |
| Leu Gln Met Arg Gly Pro Gln Ala Asp Ser Ala Gly Arg Phe Phe Gly | | | | |
| | 15 | 20 | 25 | |
| ttt gcg cag gcc aaa gcc cag ctt ccc tat ctg aag aag cta ggc atc | | | | 207 |
| Phe Ala Gln Ala Lys Ala Gln Leu Pro Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile | | | | |
| | 30 | 35 | 40 | |
| agc cac ctg tac ctc tcc cct att ttt acg gcc atg cca gat tcc aat | | | | 255 |
| Ser His Leu Tyr Leu Ser Pro Ile Phe Thr Ala Met Pro Asp Ser Asn | | | | |
| | 45 | 50 | 55 | |
| cat ggc tac gat gtc att gat ccc acc gcc atc aat gaa gag ctc ggt | | | | 303 |
| His Gly Tyr Asp Val Ile Asp Pro Thr Ala Ile Asn Glu Glu Leu Gly | | | | |
| | 60 | 65 | 70 | |
| ggc atg gag ggt ctt cga gat ctt gct gca gct aca cac gag ttg ggc | | | | 351 |
| Gly Met Glu Gly Leu Arg Asp Leu Ala Ala Ala Thr His Glu Leu Gly | | | | |
| | 75 | 80 | 85 | 90 |
| atg ggc atc atc att gat att gtt ccc aac cat tta ggt gtt gcc gtt | | | | 399 |
| Met Gly Ile Ile Ile Asp Ile Val Pro Asn His Leu Gly Val Ala Val | | | | |
| | 95 | 100 | 105 | |
| cca cat ttg aat cct tgg tgg tgg gat gtt cta aaa aac ggc aaa gat | | | | 447 |
| Pro His Leu Asn Pro Trp Trp Trp Asp Val Leu Lys Asn Gly Lys Asp | | | | |
| | 110 | 115 | 120 | |
| tcc gct ttt gag ttc tat ttc gat att gac tgg cac gaa gac aac ggt | | | | 495 |
| Ser Ala Phe Glu Phe Tyr Phe Asp Ile Asp Trp His Glu Asp Asn Gly | | | | |
| | 125 | 130 | 135 | |
| tct ggt ggc aag ctg ggc atg ccg att ctg ggt gct gaa ggc gat gaa | | | | 543 |
| Ser Gly Gly Lys Leu Gly Met Pro Ile Leu Gly Ala Glu Gly Asp Glu | | | | |
| | 140 | 145 | 150 | |
| gac aag ctg gaa ttc gcg gag ctt gat gga gag aaa gtg ctc aaa tat | | | | 591 |

Asp Lys Leu Glu Phe Ala Glu Leu Asp Gly Glu Lys Val Leu Lys Tyr
155 160 165 170
ttt gac cac ctc ttc cca atc gcg cct ggt acc gaa gaa ggg aca ccg 639
Phe Asp His Leu Phe Pro Ile Ala Pro Gly Thr Glu Glu Gly Thr Pro
175 180 185
caa gaa gtc tac aag cgc cag cat tac cgc ctg cag ttc tgg cgc gac 687
Gln Glu Val Tyr Lys Arg Gln His Tyr Arg Leu Gln Phe Trp Arg Asp
190 195 200
ggc gtg atc aac ttc cgt cgc ttc ttt tcc gtg aat acg ttg gct ggc 735
Gly Val Ile Asn Phe Arg Arg Phe Phe Ser Val Asn Thr Leu Ala Gly
205 210 215
atc agg caa gaa gat ccc ttg gtg ttt gaa cat act cat cgt ctg ctg 783
Ile Arg Gln Glu Asp Pro Leu Val Phe Glu His Thr His Arg Leu Leu
220 225 230
cgc gaa ttg gtg gcg gaa gac ctc att gac ggc gtg cgc gtc gat cac 831
Arg Glu Leu Val Ala Glu Asp Leu Ile Asp Gly Val Arg Val Asp His
235 240 245 250
ccc gac ggg ctt tcc gat cct ttt gga tat ctg cac aga ctc cgc gac 879
Pro Asp Gly Leu Ser Asp Pro Phe Gly Tyr Leu His Arg Leu Arg Asp
255 260 265
ctc att gga cct gac cgc tgg ctg atc atc gaa aag atc ttg agc gtt 927
Leu Ile Gly Pro Asp Arg Trp Leu Ile Ile Glu Lys Ile Leu Ser Val
270 275 280
gat gaa cca ctc gat ccc cgc ctg gcc gtt gat ggc acc act ggc tac 975
Asp Glu Pro Leu Asp Pro Arg Leu Ala Val Asp Gly Thr Thr Gly Tyr
285 290 295
gac ccc ctc cgt gaa ctc gac ggc gtg ttt atc tcc cga gaa tct gag 1023
Asp Pro Leu Arg Glu Leu Asp Gly Val Phe Ile Ser Arg Glu Ser Glu
300 305 310

gac aaa ttc tcc atg ttg gcg ctg acc cac agt gga tcc acc tgg gat 1071
 Asp Lys Phe Ser Met Leu Ala Leu Thr His Ser Gly Ser Thr Trp Asp
 315 320 325 330
 gaa cgc gcc cta aaa tcc acg gag gaa agc ctc aaa cga gtc gtc gcg 1119
 Glu Arg Ala Leu Lys Ser Thr Glu Glu Ser Leu Lys Arg Val Val Ala
 335 340 345
 caa caa gaa ctc gca gcc gaa atc tta agg ctc gcc cgc gcc atg cgc 1167
 Gln Gln Glu Leu Ala Ala Glu Ile Leu Arg Leu Ala Arg Ala Met Arg
 350 355 360
 cgc gat aac ttc tcc acc gca ggc acc aac gtc acc gaa gac aaa ctt 1215
 Arg Asp Asn Phe Ser Thr Ala Gly Thr Asn Val Thr Glu Asp Lys Leu
 365 370 375
 agc gaa acc atc atc gaa tta gtc gcc gcc atg ccc gtc tac cgc gcc 1263
 Ser Glu Thr Ile Ile Glu Leu Val Ala Ala Met Pro Val Tyr Arg Ala
 380 385 390
 gac tac atc tcc ctc tca cgc acc acc gcc acc gtc atc gcg gag atg 1311
 Asp Tyr Ile Ser Leu Ser Arg Thr Thr Ala Thr Val Ile Ala Glu Met
 395 400 405 410
 tcc aaa cgc ttc ccc tcc cgg cgc gac gca ctc gac ctc atc tcg gcc 1359
 Ser Lys Arg Phe Pro Ser Arg Arg Asp Ala Leu Asp Leu Ile Ser Ala
 415 420 425
 gcc cta ctt ggc aat ggc gag gcc aaa atc cgc ttc gcc caa gtc tgc 1407
 Ala Leu Leu Gly Asn Gly Glu Ala Lys Ile Arg Phe Ala Gln Val Cys
 430 435 440
 ggc gcc gtc atg gcc aaa ggt gtg gaa gac acc acc ttc tac cgc gca 1455
 Gly Ala Val Met Ala Lys Gly Val Glu Asp Thr Thr Phe Tyr Arg Ala
 445 450 455
 tct agg ctc gtt gca ctg caa gaa gtc ggt ggc gcg ccg ggc agg ttc 1503
 Ser Arg Leu Val Ala Leu Gln Glu Val Gly Gly Ala Pro Gly Arg Phe

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 460 | 465 | 470 | |
| ggc gtc tcc gct gca gaa ttc cac ttg ctg cag gaa gaa cgc agc ctg | | | 1551 |
| Gly Val Ser Ala Ala Glu Phe His Leu Leu Gln Glu Glu Arg Ser Leu | | | |
| 475 | 480 | 485 | 490 |
| ctg tgg cca cgc acc atg acc acc ttg tcc acg cac gac acc aaa cgc | | | 1599 |
| Leu Trp Pro Arg Thr Met Thr Thr Leu Ser Thr His Asp Thr Lys Arg | | | |
| 495 | 500 | 505 | |
| ggc gaa gat acc cgc gcc cgc atc atc tcc ctg tcc gaa gtc ccc gat | | | 1647 |
| Gly Glu Asp Thr Arg Ala Arg Ile Ile Ser Leu Ser Glu Val Pro Asp | | | |
| 510 | 515 | 520 | |
| atg tac tcc gag ctg gtc aat cgt gtt ttc gca gtg ctc ccc gcg cca | | | 1695 |
| Met Tyr Ser Glu Leu Val Asn Arg Val Phe Ala Val Leu Pro Ala Pro | | | |
| 525 | 530 | 535 | |
| gac ggc gca acg ggc agt ttc ctc cta caa aac ctg ctg ggc gta tgg | | | 1743 |
| Asp Gly Ala Thr Gly Ser Phe Leu Leu Gln Asn Leu Leu Gly Val Trp | | | |
| 540 | 545 | 550 | |
| ccc gcc gac ggc gtg atc acc gat gcg ctg cgc gat cga ttc agg gaa | | | 1791 |
| Pro Ala Asp Gly Val Ile Thr Asp Ala Leu Arg Asp Arg Phe Arg Glu | | | |
| 555 | 560 | 565 | 570 |
| tac gcc cta aaa gct atc cgc gaa gca tcc aca aaa acc acg tgg gtg | | | 1839 |
| Tyr Ala Leu Lys Ala Ile Arg Glu Ala Ser Thr Lys Thr Thr Trp Val | | | |
| 575 | 580 | 585 | |
| gac ccc aac gag tcc ttc gag gct gcg gtc tgc gat tgg gtg gaa gcg | | | 1887 |
| Asp Pro Asn Glu Ser Phe Glu Ala Ala Val Cys Asp Trp Val Glu Ala | | | |
| 590 | 595 | 600 | |
| ctt ttc gac gga ccc tcc acc tca tta atc acc gaa ttt gtc tcc cac | | | 1935 |
| Leu Phe Asp Gly Pro Ser Thr Ser Leu Ile Thr Glu Phe Val Ser His | | | |
| 605 | 610 | 615 | |
| atc aac cgt ggc tct gtg aat atc tcc tta ggt agg aaa ctg ctg caa | | | 1983 |

| | |
|--|------|
| Ile Asn Arg Gly Ser Val Asn Ile Ser Leu Gly Arg Lys Leu Leu Gln | |
| 620 625 630 | |
| atg gtg ggc gct gga atc ccc gac act tac caa gga act gag ttt tta | 2031 |
| Met Val Gly Ala Gly Ile Pro Asp Thr Tyr Gln Gly Thr Glu Phe Leu | |
| 635 640 645 650 | |
| gaa gac tcc ctg gta gat ccc gat aac cga cgc ttt gtt gat tac acc | 2079 |
| Glu Asp Ser Leu Val Asp Pro Asp Asn Arg Arg Phe Val Asp Tyr Thr | |
| 655 660 665 | |
| gcc aga gaa caa gtc ctg gag cgc ctg caa acc tgg gat tgg acg cag | 2127 |
| Ala Arg Glu Gln Val Leu Glu Arg Leu Gln Thr Trp Asp Trp Thr Gln | |
| 670 675 680 | |
| gtt aat tcg gta gaa gac ttg gtg gat aac gcc gac atc gcc aaa atg | 2175 |
| Val Asn Ser Val Glu Asp Leu Val Asp Asn Ala Asp Ile Ala Lys Met | |
| 685 690 695 | |
| gcc gtg gtc cat aaa tcc ctc gag ttg cgt gct gaa ttt cgt gca agc | 2223 |
| Ala Val Val His Lys Ser Leu Glu Leu Arg Ala Glu Phe Arg Ala Ser | |
| 700 705 710 | |
| ttt gtt ggt gga gat cat cag gca gta ttt ggc gaa ggt cgc gca gaa | 2271 |
| Phe Val Gly Gly Asp His Gln Ala Val Phe Gly Glu Gly Arg Ala Glu | |
| 715 720 725 730 | |
| tcc cac atc atg ggc atc gcc cgc ggt aca gac cga aac cac ctc aac | 2319 |
| Ser His Ile Met Gly Ile Ala Arg Gly Thr Asp Arg Asn His Leu Asn | |
| 735 740 745 | |
| atc att gct ctt gct acc cgt cga cca ctg atc ttg gaa gac cgt ggc | 2367 |
| Ile Ile Ala Leu Ala Thr Arg Arg Pro Leu Ile Leu Glu Asp Arg Gly | |
| 750 755 760 | |
| gga tgg tat gac acc acc gtc acg ctt cct ggt gga caa tgg gaa gac | 2415 |
| Gly Trp Tyr Asp Thr Thr Val Thr Leu Pro Gly Gly Gln Trp Glu Asp | |
| 765 770 775 | |

agg ctc acc ggg caa cgc ttc agt ggt gtt gtc cca gcc acc gat ttg 2463
Arg Leu Thr Gly Gln Arg Phe Ser Gly Val Val Pro Ala Thr Asp Leu

780

785

790

ttc tca cat tta ccc gta tct ttg ttg gtt tta gta ccc gat agt gag 2511
Phe Ser His Leu Pro Val Ser Leu Leu Val Leu Val Pro Asp Ser Glu

795

800

805

810

ttt tgatccctgc acaggaaagt tagcggcgct actatgaacg atcgatatgt 2564
Phe

ctgacaacac tctctcccaa ttggcagtt actaccacga attccgacgt gcccatccca 2624
tggccgacgt cgaattcctc ctagcaattg aagaattact cacagacggt ggtgtcacct 2684
tcgatcgcgt caccacacgc atcaaagaat ggtcaagcct gaaagccaag gctcgcaagc 2744
gtcgcgacga tggctcggtg atctaccctg atccgcgcaa agacatccac gacatgatcg 2804
gtgttcggat caccacgtac cactccacgg aaattcccgt ggccttaaaa gtgctccaag 2864
actccttcac cgtccacaaa tccgtagaca aagccgctga aactcgcac tcaggcggct 2924
ttggttacgg ctcccaccac caaggattnt ag 2956

【 0 0 9 2 】

<210> 32

<211> 811

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 32

Met Ala Arg Pro Ile Ser Ala Thr Tyr Arg Leu Gln Met Arg Gly Pro

1

5

10

15

Gln Ala Asp Ser Ala Gly Arg Phe Phe Gly Phe Ala Gln Ala Lys Ala

20

25

30

Gln Leu Pro Tyr Leu Lys Lys Leu Gly Ile Ser His Leu Tyr Leu Ser

35

40

45

Pro Ile Phe Thr Ala Met Pro Asp Ser Asn His Gly Tyr Asp Val Ile

| | | |
|---|-----|-----|
| 50 | 55 | 60 |
| Asp Pro Thr Ala Ile Asn Glu Glu Leu Gly Gly Met Glu Gly Leu Arg | | |
| 65 | 70 | 75 |
| Asp Leu Ala Ala Ala Thr His Glu Leu Gly Met Gly Ile Ile Ile Asp | | |
| 85 | 90 | 95 |
| Ile Val Pro Asn His Leu Gly Val Ala Val Pro His Leu Asn Pro Trp | | |
| 100 | 105 | 110 |
| Trp Trp Asp Val Leu Lys Asn Gly Lys Asp Ser Ala Phe Glu Phe Tyr | | |
| 115 | 120 | 125 |
| Phe Asp Ile Asp Trp His Glu Asp Asn Gly Ser Gly Gly Lys Leu Gly | | |
| 130 | 135 | 140 |
| Met Pro Ile Leu Gly Ala Glu Gly Asp Glu Asp Lys Leu Glu Phe Ala | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Glu Leu Asp Gly Glu Lys Val Leu Lys Tyr Phe Asp His Leu Phe Pro | | |
| 165 | 170 | 175 |
| Ile Ala Pro Gly Thr Glu Glu Gly Thr Pro Gln Glu Val Tyr Lys Arg | | |
| 180 | 185 | 190 |
| Gln His Tyr Arg Leu Gln Phe Trp Arg Asp Gly Val Ile Asn Phe Arg | | |
| 195 | 200 | 205 |
| Arg Phe Phe Ser Val Asn Thr Leu Ala Gly Ile Arg Gln Glu Asp Pro | | |
| 210 | 215 | 220 |
| Leu Val Phe Glu His Thr His Arg Leu Leu Arg Glu Leu Val Ala Glu | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Asp Leu Ile Asp Gly Val Arg Val Asp His Pro Asp Gly Leu Ser Asp | | |
| 245 | 250 | 255 |
| Pro Phe Gly Tyr Leu His Arg Leu Arg Asp Leu Ile Gly Pro Asp Arg | | |
| 260 | 265 | 270 |
| Trp Leu Ile Ile Glu Lys Ile Leu Ser Val Asp Glu Pro Leu Asp Pro | | |
| 275 | 280 | 285 |

Arg Leu Ala Val Asp Gly Thr Thr Gly Tyr Asp Pro Leu Arg Glu Leu
 290 295 300
 Asp Gly Val Phe Ile Ser Arg Glu Ser Glu Asp Lys Phe Ser Met Leu
 305 310 315 320
 Ala Leu Thr His Ser Gly Ser Thr Trp Asp Glu Arg Ala Leu Lys Ser
 325 330 335
 Thr Glu Glu Ser Leu Lys Arg Val Val Ala Gln Gln Glu Leu Ala Ala
 340 345 350
 Glu Ile Leu Arg Leu Ala Arg Ala Met Arg Arg Asp Asn Phe Ser Thr
 355 360 365
 Ala Gly Thr Asn Val Thr Glu Asp Lys Leu Ser Glu Thr Ile Ile Glu
 370 375 380
 Leu Val Ala Ala Met Pro Val Tyr Arg Ala Asp Tyr Ile Ser Leu Ser
 385 390 395 400
 Arg Thr Thr Ala Thr Val Ile Ala Glu Met Ser Lys Arg Phe Pro Ser
 405 410 415
 Arg Arg Asp Ala Leu Asp Leu Ile Ser Ala Ala Leu Leu Gly Asn Gly
 420 425 430
 Glu Ala Lys Ile Arg Phe Ala Gln Val Cys Gly Ala Val Met Ala Lys
 435 440 445
 Gly Val Glu Asp Thr Thr Phe Tyr Arg Ala Ser Arg Leu Val Ala Leu
 450 455 460
 Gln Glu Val Gly Gly Ala Pro Gly Arg Phe Gly Val Ser Ala Ala Glu
 465 470 475 480
 Phe His Leu Leu Gln Glu Glu Arg Ser Leu Leu Trp Pro Arg Thr Met
 485 490 495
 Thr Thr Leu Ser Thr His Asp Thr Lys Arg Gly Glu Asp Thr Arg Ala
 500 505 510
 Arg Ile Ile Ser Leu Ser Glu Val Pro Asp Met Tyr Ser Glu Leu Val

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 515 | 520 | 525 | |
| Asn Arg Val Phe Ala Val Leu Pro Ala Pro Asp Gly Ala Thr Gly Ser | | | |
| 530 | 535 | 540 | |
| Phe Leu Leu Gln Asn Leu Leu Gly Val Trp Pro Ala Asp Gly Val Ile | | | |
| 545 | 550 | 555 | 560 |
| Thr Asp Ala Leu Arg Asp Arg Phe Arg Glu Tyr Ala Leu Lys Ala Ile | | | |
| 565 | 570 | 575 | |
| Arg Glu Ala Ser Thr Lys Thr Thr Trp Val Asp Pro Asn Glu Ser Phe | | | |
| 580 | 585 | 590 | |
| Glu Ala Ala Val Cys Asp Trp Val Glu Ala Leu Phe Asp Gly Pro Ser | | | |
| 595 | 600 | 605 | |
| Thr Ser Leu Ile Thr Glu Phe Val Ser His Ile Asn Arg Gly Ser Val | | | |
| 610 | 615 | 620 | |
| Asn Ile Ser Leu Gly Arg Lys Leu Leu Gln Met Val Gly Ala Gly Ile | | | |
| 625 | 630 | 635 | 640 |
| Pro Asp Thr Tyr Gln Gly Thr Glu Phe Leu Glu Asp Ser Leu Val Asp | | | |
| 645 | 650 | 655 | |
| Pro Asp Asn Arg Arg Phe Val Asp Tyr Thr Ala Arg Glu Gln Val Leu | | | |
| 660 | 665 | 670 | |
| Glu Arg Leu Gln Thr Trp Asp Trp Thr Gln Val Asn Ser Val Glu Asp | | | |
| 675 | 680 | 685 | |
| Leu Val Asp Asn Ala Asp Ile Ala Lys Met Ala Val Val His Lys Ser | | | |
| 690 | 695 | 700 | |
| Leu Glu Leu Arg Ala Glu Phe Arg Ala Ser Phe Val Gly Gly Asp His | | | |
| 705 | 710 | 715 | 720 |
| Gln Ala Val Phe Gly Glu Gly Arg Ala Glu Ser His Ile Met Gly Ile | | | |
| 725 | 730 | 735 | |
| Ala Arg Gly Thr Asp Arg Asn His Leu Asn Ile Ile Ala Leu Ala Thr | | | |
| 740 | 745 | 750 | |

Arg Arg Pro Leu Ile Leu Glu Asp Arg Gly Gly Trp Tyr Asp Thr Thr
755 760 765

Val Thr Leu Pro Gly Gly Gln Trp Glu Asp Arg Leu Thr Gly Gln Arg
770 775 780

Phe Ser Gly Val Val Pro Ala Thr Asp Leu Phe Ser His Leu Pro Val
785 790 795 800

Ser Leu Leu Val Leu Val Pro Asp Ser Glu Phe
805 810

【0093】

<210> 33

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 33

ccaaaatcga taacatcaat cgagatcggg

30

【0094】

<210> 34

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 34

cttgatcgat taaaaacgct cgacgagccg

30

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 コリネ型細菌を用いた発酵法によるL-グルタミン酸の製造において、トレハロースの副生を抑制し、L-グルタミン酸の生産効率を向上させること。

【解決手段】 トレハロース合成能を、例えば、トレハロース-6-リン酸シンターゼをコードする遺伝子、又はマルトオリゴシルトレハロースシンターゼをコードする遺伝子又はこれらの両方の遺伝子を破壊することにより低下又は欠失し、かつ、L-グルタミン酸生産能を有するコリネ型細菌を培地に培養し、同培地中にL-グルタミン酸を生成、蓄積させ、同培地からL-グルタミン酸を採取することにより、L-グルタミン酸を製造する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号
氏 名 味の素株式会社